



(51) 国際特許分類6 A61K 38/17, 38/22	A1	(11) 国際公開番号 WO00/16795 (43) 国際公開日 2000年3月30日 (30.03.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05080 (22) 国際出願日 1999年9月17日 (17.09.99) (30) 優先権データ 特願平10/263004 1998年9月17日 (17.09.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 雪印乳業株式会社 (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.)(JP/JP) 〒065-0043 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号 Hokkaido, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 後藤雅昭(GOTO, Masaaki)(JP/JP) 〒329-0511 栃木県下都賀郡石橋町下古山456-1 Tochigi, (JP) 友保昌拓(TOMOYASU, Akihiro)(JP/JP) 〒329-0519 栃木県下都賀郡石橋町大松山1-3-3 SKマンション3-E Tochigi, (JP) 山口京二(YAMAGUCHI, Kyoji)(JP/JP) 〒330-0006 埼玉県大宮市島町702-12 ライオンズガーデン東大宮1-524 Saitama, (JP)	木野崎雅彦(KINOSAKI, Masahiko)(JP/JP) 〒329-0528 栃木県河内郡上三川町ゆきが丘53-8 Tochigi, (JP) 中川信明(NAKAGAWA, Nobuaki)(JP/JP) 〒329-0415 栃木県下都賀郡国分寺町川名子31-1 ハイツサカエE201 Tochigi, (JP) (74) 代理人 藤野清也(FUJINO, Seiya) 〒160-0004 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, CA, CN, HU, JP, KR, NO, NZ, US, ZA, 欧州 特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, IE, IT, LU, NL, SE) 添付公開書類 国際調査報告書	
(54)Title: PREVENTIVES AND/OR REMEDIES FOR OBESITY (54)発明の名称 肥満予防及び／又は治療剤 (57) Abstract Novel preventives and/or remedies for obesity. These preventives and/or remedies contain as the active ingredient stanniocalcin. Because of having an excellent activity of inhibiting the differentiation and maturation of adipocytes, they are useful as drugs for preventing and/or treating obesity.		

(57)要約

新規な肥満予防及び／又は治療剤を提供する。

スタンニオカルシンを有効成分とする肥満予防及び／又は治療剤。

優れた脂肪細胞分化、成熟抑制活性を有し、肥満予防及び／又は治療のための
医薬として有用。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レソト	SK スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シェラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BE ベルギー	GE グルジア	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MA モロッコ	TD チャード
BG ブルガリア	GM ガンビア	MC モナコ	TG トーゴ
BJ ベナン	GN ギニア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BR ブラジル	GW ギニア・ビサウ	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア 共和国	TM トルクメニスタン
CA カナダ	HR クロアチア	ML マリ	TR トルコ
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	MN モンゴル	TT トリニダード・トバゴ
CG コンゴ	ID インドネシア	MR モーリタニア	UA ウクライナ
CH スイス	IE アイルランド	MW マラウイ	UG ウガンダ
CJ コートジボアール	IL イスラエル	MX メキシコ	US 米国
CM カメルーン	IN インド	NE ニジェール	UZ ウズベキスタン
CN 中国	IS アイスランド	NL オランダ	VN ヴィエトナム
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NO ノルウェー	YU ユーゴスラビア
CU キューバ	JP 日本	NZ ニュー・ジーランド	ZA 南アフリカ共和国
CY キプロス	KE ケニア	PL ポーランド	ZW ジンバブエ
CZ チェコ	KG キルギスタン	PT ポルトガル	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	RO ルーマニア	
DK デンマーク	KR 韓国		

明 細 書

肥満予防及び／又は治療剤

技術分野

本発明は、新規な肥満予防及び／又は治療剤に関する。

本発明製剤は、肥満に対する優れた予防及び／又は治療効果を有し、医薬として有用である。

背景技術

肥満は、糖尿病、高血圧症、心臓病などのリスクファクターであり、先進国の国民の健康を脅かす存在である。肥満とは、脂肪組織が普通以上に蓄積した身体状況のことを言う。脂肪組織は、生体内の余剰エネルギーを脂肪、即ちトリグリセライドとして備蓄している特殊な器官であり、脂肪細胞、その前駆細胞を含む線維芽細胞、マクロファージ、血管周囲細胞、血液細胞などから構成されている。脂肪細胞は、脂肪組織に存在する細胞の1／3から2／3を占めると言われており、その細胞内に脂肪、即ちトリグリセライドを蓄積している。脂肪細胞は、間葉系の多能性幹細胞から、脂肪細胞としての素地を獲得した脂肪芽細胞、脂肪滴は出現していないが脂肪細胞の初期マーカーを有する前駆脂肪細胞、脂肪滴を有する未成熟脂肪細胞、脂肪が多量に蓄積した成熟脂肪細胞へと分化・成熟していくとされている。軽度の肥満成人の生体内では、個々の脂肪細胞が蓄積している脂肪、即ちトリグリセライド量が増加し細胞が肥大化している。肥満の程度が大きくなると脂肪細胞の数も増加する。従って、脂肪細胞への分化・成熟を抑制し脂肪細胞の数を減少させることや、成熟脂肪細胞の肥大化を抑制することにより、蓄積脂肪量の増加を抑制し肥満の進行を止め、肥満を治療することが期待される。生体内における脂肪細胞の分化制御は、食物摂取や運動などの環境因子などから派生する数多くの因子によって、正あるいは負に行われていることが明らかにされてきた。前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化を抑制するサイトカインとして、

腫瘍壊死因子- α ; (TNF- α : Torti F.M. et al., Science, Vol.229, p867 (1985))、トランスフォーミング増殖因子- β (transforming growth factor- β ; Ignatz R.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.82, p8530 (1985))、プレアディポサイトファクター-1 (Pref-1, Preadipocyte factor-1 : Smas C.M. et al., Cell, Vol.73, p725 (1993))などのサイトカインが報告されている。又、近年クローニングされたob遺伝子の翻訳蛋白質レプチンは、おそらくは中枢神経を介して摂食量や脂肪組織重量を減少させることが報告されている (Levin N. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93. p1726, 1996)。さらには、強力な摂食促進作用を有する脳内ペプチド・ニューロペプチドYとそのレセプターも肥満を抑制する医薬品開発の強力なツールとして注目されている (Sainsburg A. et al. Diabetologia, Vol. 39, p353, 1996)。これらのサイトカインは、脂肪細胞における脂肪蓄積抑制作用による肥満の治療剤となることが期待され、レプチンなど上記のサイトカインの一部については、肥満の治療剤又は予防薬として臨床試験が進められている。

また現在、肥満の治療薬又は予防薬として、米国では既にレダックス (アメリカンホームプロダクツ社) が上市されている。又、メリディア (クノール社) やキセニカル (ロッシュ社) など、米国において肥満の治療薬又は脂肪の吸収抑制薬として認可される見通しである。しかし、これらの薬剤を用いた治療法はその効果並びに治療結果において必ずしも満足できるものではなく、これらに代わるより有効性が高く副作用の少ない新しい治療薬の開発が望まれていた。

発明の開示

本発明者らは、上述の状況に鑑み抗肥満作用あるいは肥満の改善作用を有する物質を求め鋭意探索の結果、従来ミネラル代謝を調節する蛋白質として知られているスタンニオカルシン (Stanniocalcin ; S T C : Olsen H.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.93, p1792 (1996))が、脂肪細胞形成抑制活性、即ち脂肪細胞の分化及び又は成熟を抑制する活性を有するというスタンニオカルシ

ンの全く予想しなかった生理活性を見い出すに至った。従って本発明は、新規な物質を有効成分とする肥満予防及び／又は治療剤を提供することを課題とする。本発明は、スタンニオカルシンを有効成分とする、肥満予防及び／又は治療剤に関する。本発明製剤は、肥満に対する優れた予防及び／又は治療効果を有し、医薬として有用である。

スタンニオカルシンは最初魚類で発見され、その後ヒトを含む哺乳類にも存在することが明らかとなった。そして、構造の類似性を基に遺伝子工学的にヒト胎児胚の cDNA が単離された。ヒトスタンニオカルシンは、得られた cDNA を遺伝子工学的手法を用いて各種細胞に発現させることにより得ることができる。

スタンニオカルシンを魚に投与すると生体内のカルシウム量が低下すること、及びラットに投与するとリン酸の尿への排泄量が低下することが知られている (Proc. Natl. Aca. Sci. USA., 93, 1792 (1996))。しかし、スタンニオカルシンが肥満に対して優れた予防及び治療効果を有することは知られていない。

発明を実施するための最良の形態

本発明の有効成分であるスタンニオカルシンは、Olsen H. S. らの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.93, p1792 (1996)) により得ることができる。具体的には、上述の文献あるいはジーンバンク等を検索することにより、スタンニオカルシンの cDNA 配列を知ることができ、その配列情報に基づいて、PCR 法等を用いてスタンニオカルシンの cDNA を得ることができる。得られた cDNA を挿入した発現ベクターを動物細胞等にトランスフェクトして、スタンニオカルシン発現細胞を得ることができる。得られたスタンニオカルシン発現細胞を培養した培養液から常法により精製することにより、スタンニオカルシンを得ることができる。

脂肪細胞形成抑制活性は、Kodama H. らの方法 (Journal of Cellular Physiology, Vol.112, p83 (1982))、即ち、マウス前駆脂肪細胞株を標的細胞として用い、デキサメタゾン存在下での脂肪細胞形成の抑制を、トリグリセライドの蓄積抑制で評価することにより確認できる。

本発明の有効成分であるスタンニオカルシンは、肥満の予防及び／又は治療を目的とした医薬組成物として、ヒト及び動物に対して安全に投与されるものである。スタンニオカルシンは、製剤化して経口的あるいは非経口的に投与することができる。医薬組成物の形態としては、注射用組成物、点滴用組成物、坐剤、経鼻剤、舌下剤、経皮吸収剤などが挙げられる。これらの製剤は、公知の製剤学的製法に準じ、製剤として薬理学的に許容され得る担体、賦形剤、安定剤、着色剤、界面活性剤、その他添加剤などを用いることにより、目的とする製剤とすることができる。注射用組成物の場合は、本発明の有効成分であるスタンニオカルシンの薬理学的有効量及び製剤学的に許容し得る賦形剤／賦活剤との混合物とし、その中にアミノ酸、糖類、セルロース誘導体、及びその他の有機／無機化合物などの一般的に注射用組成物に添加される賦形剤／賦活剤を用いても良い。必要に応じてpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤などを添加し、常法によって各種注射剤とすることができる。

投与は、通常成人体重kg当たり $10\mu\text{g}$ ～ 10mg を一日数回に分けて経口的あるいは非経口的に投与する。特に好ましい投与形態は静脈内に投与することである。

実施例

以下の実施例をもって本発明をより詳細に説明するが、これらは単に例示するのみであり、これらによって本発明はなんら限定されるものではない。

実施例 1

スタンニオカルシンの製造

i) IMR-90細胞（ヒト胎児肺繊維芽細胞 ATCC CCL-186）からのポリ(A) + RN

A の単離

ファストトラックmRNAアイソレーションキット（Invitrogen社）を用い、そのマニュアルに従って 1×10^8 個のIMR-90細胞より約 $10\mu\text{g}$ のポリ(A) + RNA を単離した。

ii) ヒトスタンニオカルシン発現ベクターの構築

単離したポリ(A)⁺ RNA、1 μ g を鋳型としてスーパースクリプトII cDNA合成キット（ギブコ BRL社）を用いて、同社のプロトコールに従って一本鎖cDNAを合成し、このcDNAと、ヒトスタンニオカルシンの塩基配列よりデザインしたプライマーSTCF1N（配列表配列番号1）及びプライマーSTCR1Xh（配列表配列番号2）を用いて、PCRを行い、スタンニオカルシン(STC)cDNA断片を取得した。以下にPCRの条件を示す。

10X Ex Taqバッファー（宝酒造社）	10	μ l
2.5 mM dNTP	8	μ l
cDNA溶液	1	μ l
Ex Taq（宝酒造社）	0.5	μ l
蒸留水	74.5	μ l
20 μ M プライマーSTCF1N	5	μ l
100 μ M プライマーSTCR1Xh	1	μ l

上記の溶液を微量遠心チューブ中で混合後、以下の条件でPCRを行った。95℃で3分前処理後、95℃で30秒間、55℃で30秒間、72℃で2分間の3段階の反応を30回繰り返した後、70℃で5分間保温した。反応液の一部をアガロース電気泳動し約900bpの均一なDNA断片が得られたことを確認した。この断片を常法によりシーケンスし、スタンニオカルシンをコードするcDNAが得られたことを確認した。cDNA配列を配列表配列番号3に、アミノ酸配列を配列番号4にそれぞれ示す。

得られた約900bpのDNA断片を、QIAEXII DNA extraction kit（QIAGEN社）によって精製した。このDNA断片を制限酵素XhoIおよびNheI（宝酒造社）で切断し、QIAEXII DNA extraction kitにより精製した（STC XhoI-NheI断片）。このSTC XhoI-NheI断片を制限酵素XhoIおよびNheIで切断したpCEP4（Invitrogen社）に、ligation kit ver.2（宝酒造社）により結合させてプラスミドpCEPSTCを得た。このプラスミドは、スタンニオカルシンをコードするDNAを含んでいる。このプラスミドを含む大腸菌（DH5 α ；ギブコ BRL社）は、DH5 α /pCEP-STCとして平

成11年（1999年）5月31日に日本国茨城県つくば東1丁目1-3（郵便番号 305-8566） 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-6736として寄託されている。尚、PCR 由来の DNA部分に、DNA合成時における塩基の誤った取り込みがないことを、DNAシーケンシングにより確認した。

iii) ヒトスタンニオカルシンの発現

実施例1-ii) で得られたpCEPSTC を持つ大腸菌 DH5 α を、50 μ g/mlのアンピシリン（シグマ社）および4.7%のグリセロールを含むTerrific Broth（ライフテクノロジー社）2 ml中で37°C一晩振盪培養し、菌体からプラスミド DNAをQIAWELL kit（QIAGEN社）により精製した。293-EBNA細胞（Invitrogen社）を10%牛胎児血清を含むIMDM（ライフテクノロジー社）中 2×10^5 /ウェル/ml となるように24ウェルプレートの各ウェルに播種し、37°C一晩、CO₂ インキュベーター（5% CO₂）中で培養した。pCEPSTC あるいはpCEP4 をFugene6（ベーリンガー・マンハイム社）を用いて、293-EBNA細胞にトランスフェクトした。DNAは各 0.5 μ g、Fugene6 は1 μ l 用いた。トランスフェクション後、37°Cで3日間 CO₂インキュベーター（5% CO₂）中で培養した。得られた培養液の脂肪細胞形成抑制活性を、以下の方法により測定した。

iv) 脂肪細胞形成抑制活性の測定

脂肪細胞形成抑制活性測定は、Kodama H. らの方法（Journal of Cellular Physiology, Vol.112, p83 (1982))に従い、以下の方法により行った。即ち、マウス前駆脂肪細胞株MC3T3-G2/PA6細胞（RIKEN GENE BANK, RCB1127）を標的細胞として用い、デキサメタゾン存在下での脂肪細胞の形成をトリグリセライドの蓄積を指標として試験し、その抑制活性を測定した。96ウェルマイクロプレートに10%牛胎児血清を含む α -MEM（ギブコ BRL社）で希釈したサンプル（実施例1-iii）で得られた培養液、ベクターのみを導入した細胞の培養液、及び293-EBNA細胞のみの培養液）50 μ l を入れ、マウス前駆脂肪細胞株MC3T3-G2/PA6細胞 3×10^3 個を50 μ l の 2×10^{-7} Mデキサメタゾン及び10%牛胎児血清を含む α -MEMに懸濁さ

せて播種し、5 %CO₂、37℃、湿度 100%にて一週間培養した。培養7日後に培地を吸引除去し、風乾後、脂肪細胞中に蓄積したトリグリセライドをトリグリセライド測定キット（トリグリセライドG-テストワコー、コード番号274-69802、和光純薬工業社）を用いて測定した。この時、OD510nm の減少を脂肪細胞形成抑制活性として評価した。結果を第1表に示す。この結果、得られた培養液中のスタンニオカルシンが、脂肪細胞形成抑制活性を有することが確認された。

第1表

希 釈 率	1/4	1/8	1/16	1/32
STC 遺伝子導入細胞培養液	0.061	0.060	0.057	0.054
ベクター導入細胞培養液	0.036	0.021	0.009	0.007
293-EBNA細胞培養液	0.032	0.017	0.014	0.011

実施例 2

マウス前駆脂肪細胞株3T3-L1細胞を用いた脂肪細胞形成抑制活性の測定

マウス前駆脂肪細胞株3T3-L1細胞（ATCC寄託—受託番号CL173）を標的細胞として用い、デキサメタゾンと1-メチル-3-イソブチルキサンチン存在下での脂肪細胞の形成をトリグリセライドの蓄積を指標として試験し、その抑制活性を測定することによって、脂肪細胞形成抑制活性を評価した。即ち、96ウェルマイクロプレートに10%牛胎児血清を含む α -MEM（ギブコ BRL社）で希釈した実施例1と同様のサンプル50 μ lを入れ、マウス前駆脂肪細胞株3T3-L1細胞 5×10^3 個を50 μ lの 4×10^{-7} Mデキサメタゾン、 2×10^{-5} M 1-メチル-3-イソブチルキサンチン及び10%牛胎児血清を含む α -MEMに懸濁させて播種し、5 %CO₂、37℃、湿度 100%にて一週間培養した。培養7日後に培地を吸引除去し、風乾後、脂肪細胞中に蓄積したトリグリセライドをトリグリセライド測定キット（トリグリセライドG-テストワコー、コード番号274-69802、和光純薬工業社）を用い

て測定した。この時、OD510nm の減少を脂肪細胞形成抑制活性として評価した。結果を第 2 表に示す。この結果、3T3-L1細胞を標的細胞として用いた場合にも、実施例 1 と同様に、培養液中のスタンニオカルシンが、脂肪細胞形成抑制活性を有することが確認された。

第 2 表

希 釈 率	1/4	1/8	1/16	1/32
STC 遺伝子導入細胞培養液	0.081	0.083	0.082	0.083
ベクター導入細胞培養液	0.026	0.017	0.012	0.011
293-EBNA細胞培養液	0.021	0.004	0.006	0.016

実施例 3

製剤例

製剤例 1：注射剤の製造

実施例 1 で得られたスタンニオカルシン1mg とヒト血清アルブミン50mgを0.01 Mリン酸緩衝液（PBS、pH7.0）100ml に溶解し、滅菌後バイアル瓶に2ml ずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

製剤例 2：注射剤の製造

実施例 1 で得られたスタンニオカルシン50mg、ツイーン 80 1mg、及びヒト血清アルブミン50mgを0.01M リン酸緩衝液（PBS、pH7.0）100ml に溶解し、滅菌後バイアル瓶に5ml ずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

製剤例 3：注射剤の製造

実施例 1 で得られたスタンニオカルシン100mg、ヒト血清アルブミン50mg、及びソルビトール4gを0.01M リン酸緩衝液（PBS、pH7.0）20mlに溶解し、滅菌後バイアル瓶に2mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

産業上の利用可能性

本発明により、スタンニオカルシンを有効成分とする新規な肥満予防及び／又は治療剤が提供される。本発明製剤は、肥満に対する優れた予防及び／又は治療効果を有し、医薬として有用である。

寄託された微生物への言及

イ. 当該微生物を寄託した寄託機関の名称及びあて名

名 称：日本国通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名：日本国茨城県つくば東1丁目1-3(郵便番号 305-8566)

ロ. イの機関に寄託した日付

平成11年5月31日（平成10年8月11日に寄託された微工研菌寄第P-16933号より移管）

ハ. イの機関の寄託について付した寄託番号

FERM BP-6736

請 求 の 範 囲

1. スタンニオカルシン (Stanniocalcin)を有効成分とする、肥満予防及び／又は治療剤。

[配列表]

SEQUENCE LISTING

<110> Snow Brand Milk Products Co., Ltd.

<120> 肥満予防及び／又は治療剤

<130> SNOW-128

<160> 4

<210> 1

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized DNA

<400> 1

GGGGCTAGCC AACAACTTAG CGGAAACTT

29

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized DNA

<400> 2

CCCCTCGAGT GTGTCAACAC CCCTAAAAT

29

<210> 3

<211> 741

<212> DNA

<213> Human

<300>

<301> Olsen H. S. et al.

<302> Human stanniocalcin : a possible hormonal regulator of mineral metabolism.

<303> Proc. Natl. Acad. Sci. USA

<304> 93

<305> 5

<306> 1792

<307> 1996-03-05

<308> GenBank, U46768

<309> 1996-02-22

<400> 3

atgctccaaa actcagcagt gcttctggtg ctggtgatca gtgcttctgc aacccatgag 60

```

gcggagcaga atgactctgt gagccccagg aaatcccagag tggcggccca aaactcagct 120
gaagtgggttc gttgcctcaa cagtgtctcta caggtcggct gcggggcttt tgcatgcctg 180
gaaaactcca cctgtgacac agatgggatg tatgacatct gtaaatacctt cttgtacagc 240
gctgctaaat ttgacactca gggaaaagca ttcgtcaaag agagcttaaa atgcatcgcc 300
aacgggggtca cctccaaggt cttcctcgcc attcggaggt gctccacttt ccaaaggatg 360
attgctgagg tgcaggaaga gtgctacagc aagctgaatg tgtgcagcat cgccaagcgg 420
aaccctgaag ccatcactga ggtcgtccag ctgccaatc acttctccaa cagatactat 480
aacagacttg tccgaagcct gctggaatgt gatgaagaca cagtcagcac aatcagagac 540
agcctgatgg agaaaattgg gcctaacatg gccagcctct tccacatcct gcagacagac 600
cactgtgccc aaacacaccc acgagctgac ttcaacagga gacgcaccaa tgagccgcag 660
aagctgaaag tcctctcag gaacctccga ggtgaggagg actctccctc ccacatcaaa 720
cgcacatccc atgagagtgc a 741

```

<210> 4

<211> 247

<212> PRT

<213> Human

<300>

<301> Olsen H. S. et al.

<302> Human stanniocalcin : a possible hormonal regulator of mineral metabolism.

<303> Proc. Natl. Acad. Sci. USA

<304> 93

<305> 5

<306> 1792

<307> 1996-03-05

<400> 4

Met Leu Gln Asn Ser Ala Val Leu Leu Val Leu Val Ile Ser Ala Ser
5 10 15
Ala Thr His Glu Ala Glu Gln Asn Asp Ser Val Ser Pro Arg Lys Ser
20 25 30
Arg Val Ala Ala Gln Asn Ser Ala Glu Val Val Arg Cys Leu Asn Ser
35 40 45
Ala Leu Gln Val Gly Cys Gly Ala Phe Ala Cys Leu Glu Asn Ser Thr
50 55 60
Cys Asp Thr Asp Gly Met Tyr Asp Ile Cys Lys Ser Phe Leu Tyr Ser
65 70 75 80
Ala Ala Lys Phe Asp Thr Gln Gly Lys Ala Phe Val Lys Glu Ser Leu
85 90 95
Lys Cys Ile Ala Asn Gly Val Thr Ser Lys Val Phe Leu Ala Ile Arg
100 105 110
Arg Cys Ser Thr Phe Gln Arg Met Ile Ala Glu Val Gln Glu Glu Cys
115 120 125
Tyr Ser Lys Leu Asn Val Cys Ser Ile Ala Lys Arg Asn Pro Glu Ala
130 135 140
Ile Thr Glu Val Val Gln Leu Pro Asn His Phe Ser Asn Arg Tyr Tyr
145 150 155 160
Asn Arg Leu Val Arg Ser Leu Leu Glu Cys Asp Glu Asp Thr Val Ser
165 170 175
Thr Ile Arg Asp Ser Leu Met Glu Lys Ile Gly Pro Asn Met Ala Ser

180 185 190
Leu Phe His Ile Leu Gln Thr Asp His Cys Ala Gln Thr His Pro Arg
195 200 205
Ala Asp Phe Asn Arg Arg Arg Thr Asn Glu Pro Gln Lys Leu Lys Val
210 215 220
Leu Leu Arg Asn Leu Arg Gly Glu Glu Asp Ser Pro Ser His Ile Lys
225 230 235 240
Arg Thr Ser His Glu Ser Ala
245

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05080

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IntCl6 A61K38/17, A61K38/22		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IntCl6 A61K38/17, A61K38/22		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS, MEDLINE, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 95/24411, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 14 September, 1995 (14.09.95), Full text & JP, 9-511140, A & US, 5837498, A & US, 5877290, A & EP, 750626, A1	1
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 December, 1999 (10.12.99)		Date of mailing of the international search report 21 December, 1999 (21.12.99)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
IntCl ⁶ A61K38/17, A61K38/22		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
IntCl ⁶ A61K38/17, A61K38/22		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CAPLUS, MEDLINE, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 95/24411, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 14. 9月. 1995 (14. 09. 95), 全文参照 & JP, 9-511140, A & US, 5837498, A & US, 5877290, A & EP, 750626, A1	1
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
10. 12. 99	21.12.99	
国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官 (権限のある職員)	4C 9639
日本国特許庁 (ISA/J P)	大宅 郁治	
郵便番号100-8915	電話番号 03-3581-1101	内線 3452
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		